

**(51) Internationale Patentklassifikation <sup>5</sup> :**  
**C07D 493/04, C12P 17/18**  
**A01N 43/90, A61K 31/425**  
**// (C07D 493/04, 313:00, 303:00)**  
**(C12P 17/18, C12R 1:00)**

A1

**(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/10121**

**(43) Internationales  
Veröffentlichungsdatum: 27. Mai 1993 (27.05.93)**

**(21) Internationales Aktenzeichen:** PCT/EP92/02656

**(22) Internationales Anmeldedatum:**  
19. November 1992 (19.11.92)

**(30) Prioritätsdaten:**  
P 41 38 042.8      19. November 1991 (19.11.91) DE

**(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):** GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig [DE]. CIBA-GEIGY AG [CH/CH]; Klybeckstr. 141, CH-4002 Basel [CH].

**(72) Erfinder: und**

**(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : HÖFLE, Gerhard [DE/DE]; BEDORF, Norbert [DE/DE]; GERTH, Klaus [DE/DE]; REICHENBACH, Hans [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE).**

(74) **Anwälte:** BOETERS, Hans, D. usw. ; Bereiteranger 15, D-8000 München 90 (DE).

(81) **Bestimmungsstaaten:** AU, CA, FI, HU, JP, KR, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE).

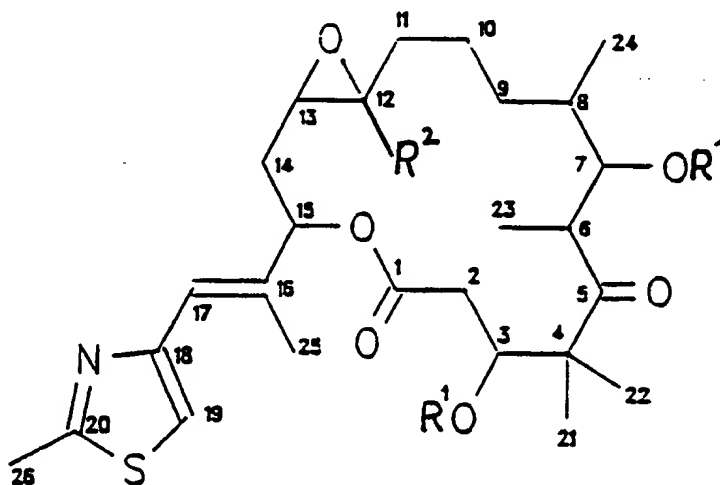
**Veröffentlicht**  
*Mit internationalem Recherchenbericht.*

PTO 2003-1133

**S.T.I.C. Translations Branch**

**(54) Title: EPOTHILONES, PROCESS FOR PREPARING THE SAME AND THEIR USE AS MEDICAMENTS AND AS PLANT PROTECTING AGENTS**

**(54) Bezeichnung:** EPOTHILONE, DEREN HERSTELLUNGSVERFAHREN UND IHRE VERWENDUNG ALS ARZNEI-MITTEL UND PFLANZENSCHÜTZENDE MITTEL



(I)

**(57) Abstract**

**Epothilones having general formula (I), a process for preparing the same and epothilone-containing agents are disclosed.**

### **(57) Zusammenfassung**

**Die Erfindung betrifft Epothilone der allgemeinen Formel (I). Herstellungsverfahren sowie Epothilone enthaltende Mittel.**

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

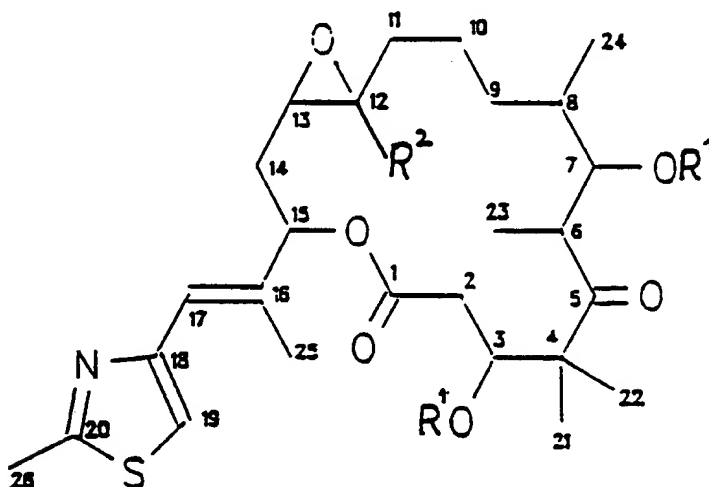
Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NZ	Neuseeland
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	PL	Polen
BJ	Benin	IE	Irland	PT	Portugal
BR	Brasilien	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SD	Sudan
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KZ	Kasachstan	SK	Slowakische Republik
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SU	Sowjet Union
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CZ	Tschechische Republik	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	UA	Ukraine
DK	Dänemark	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam
FI	Finnland				

- 1 -

# EPOTHILONE, DEREN HERSTELLUNGSVERFAHREN UND IHRE VERWENDUNG ALS ARZNEIMITTEL UND PFLANZENSCHÜTZENDE MITTEL

Die Erfindung betrifft Epothilone der folgenden allgemeinen Formel:



worin R<sup>1</sup> Wasserstoff, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkanoyl, Li<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, 1/2 Mg<sup>2+</sup> oder 1/2 Ca<sup>2+</sup> bedeutet und R<sup>2</sup> Wasserstoff oder eine Methylgruppe darstellt.

Ferner betrifft die Erfindung ein Epothilon, gekennzeichnet durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:

<sup>1</sup> H-NMR-Daten			<sup>13</sup> C-NMR-Daten	
Atom			Atom	
2a	2,4	dd	1	170,5
2b	2,52	dd	2	39,1
3	4,19	dd	3	73,2
6	3,2	m	4	53,0
7	3,78	dd	5	219,9
8	1,73	m	6	43,5
9a	1,4	m	7	74,7
9b	1,52	m	8	36,4
10a	1,4	m	9	30,7
10b	1,4	m	10	23,6
11a	1,42	m	11	27,6
11b	1,7	m	12	57,4
12	2,9	ddd	13	54,6
13	3,01	ddd	14	31,7
14a	1,85	ddd	15	76,8
14b	2,11	ddd	16	137,4
15	5,41	dd	17	120,1
17	6,6	s	18	152,1
19	6,99	s	19	116,3
21*	1,08	s	20	165,0
22*	1,35	s	21*	20,4
23	1,15	d	22*	21,6
24	0,93	d	23	14,1
25	2,05	s	24	17,1
26	2,69	s	25	15,6
			26	19,1

\*) Zuordnung vertauschbar

$C_{26}H_{39}NO_6S$  [493]

FAB-MS (neg. Ionen): 492.25 für  $(M - H)^-$

UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  ( $\log \epsilon$ ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Irtran:

$\nu$ : 3429; 2966; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087; 1029; 1014; 979  $cm^{-1}$

DC:  $R_F = 0,75$

DC-Alufolie 60 F<sub>254</sub>, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion: 1. UV-Löschung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzen auf 120 °C,  
braune Anfärbung

HPLC:  $R_t = 5,4$  min

Säule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7  $\mu m$ , Merck;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

Des weiteren betrifft die Erfindung ein Epothilon, gekennzeichnet durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:

<sup>1</sup> H-NMR-Daten			<sup>13</sup> C-NMR-Daten	
Atom			Atom	
2a	2,22	dd	1	170,5
2b	2,53	dd	2	39,4
3	4,24	dd	3	72,9
6	3,28	m	4	53,2
7	3,75	dd	5	219,8
8	1,73	m	6	43,1
9a	1,4	m	7	74,3
9b	1,5	m	8	36,6
10a	1,4	m	9	30,9
10b	1,4	m	10	22,5
11a	1,42	m	11	32,3
11b	1,7	m	12	61,3
12	-		13	61,7
13	2,8	dd	14	32,4
14a	1,9	ddd	15	76,9
14b	2,1	ddd	16	137,5
15	5,41	dd	17	120,0
17	6,6	s	18	152,1
19	6,99	s	19	116,2
21*	1,05	s	20	165,1
22*	1,36	s	21*	19,7
23	1,15	d	22*	21,5
24	0,92	d	23	13,7
25	2,05	s	24	17,1
26	2,69	s	25	15,7
27	1,28	s	26	19,3 (R <sup>1</sup> = CH <sub>3</sub> )

\*) Zuordnung vertauschbar

- 5 -

 $C_{27}H_{41}NO_6S$  [507]FAB-MS (neg. Ionen): 506.25 für  $(M - H)^-$ UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  ( $\log \epsilon$ ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Intran:

 $\nu$  = 3400; 2958; 2931; 2875; 1735; 1689; 1629; 1609; 1463; 1378; 1250; 1149; 1049; 977  $cm^{-1}$ DC:  $R_F$  = 0,75DC-Alufolie 60 F<sub>254</sub>, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

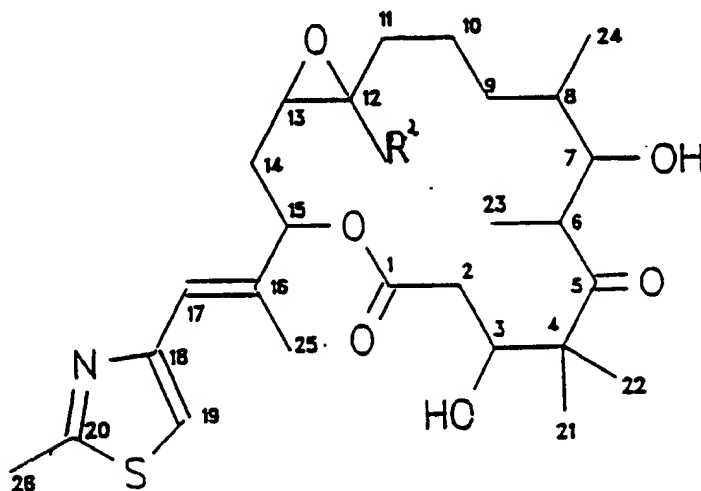
Detektion: 1. UV-Löschung bei 254 nm  
 2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzt auf 120 °C,  
 braune Anfärbung

HPLC:  $R_t$  = 6,3 minSäule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7  $\mu m$ , Merck;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

Besonders bevorzugt sind Epothilone mit der folgenden Strukturformel:



worin R<sup>2</sup> Wasserstoff oder Methyl bedeutet. (Das Kohlenstoffatom der Methylgruppe wird als C27 bezeichnet). Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Gewinnen von Epothilonen, insbesondere der vorstehend charakterisierten Epothilone, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man den Stamm So ce90 DSM 6773

- in einem Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen und Mineralsalze enthaltenden Medium kultiviert,
- entweder während der Kultivierung des Stammes oder anschließend ein Adsorberharz zusetzt,
- die Fermenterbrühe abtrennt,
- die Epothilone aus dem Adsorberharz eluiert und
- die Eluate direkt oder über weitere Reinigungsschritte von dem/den Lösungsmittel(n) befreit,
- und gegebenenfalls über Hochdruck/Niederdruckchromatographie und/oder Umkristallisation die verschiedenen Epothilone aufreinigt und voneinander trennt.

Gegebenenfalls können die so gewonnenen Epothilone mit gängigen chemischen Verfahren weiter umgesetzt werden, z.B. mit Basen in die Alkali- und Erdalkalisalze überführt und gegebenenfalls weiter zu Ethern umgesetzt werden, oder sie können mit organischen Säuren in die entsprechenden Ester überführt werden.

Ferner betrifft die Erfindung ein Mittel für den Pflanzenschutz in Landwirtschaft, Forstwirtschaft und/oder Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilone oder eines oder mehrere dieser Epothilone enthaltend, gegebenenfalls neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).



Schließlich betrifft die Erfindung ein therapeutisches Mittel, das insbesondere cytotoxische Aktivitäten entwickeln und/oder Immunsuppression bewirken kann, bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilone oder eines oder mehrere dieser Epothilone enthaltend, gegebenenfalls neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

- Administrationsform: oral
- Dosis 0.5 bis 200 mg für einen Menschen mit 70 kg Normalgewicht
- Verwendungszweck: Antitumor

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen und experimentellen Daten näher erläutert.

### Produktionsstamm

Stamm So ce90 wurde im Juli 1985 an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) aus einer Bodenprobe von den Ufern des Zambesi, im südlichen Afrika, isoliert. Der Stamm ist bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ) unter Nr. 6773 hinterlegt.

Stammkultur und morphologische Beschreibung: Der Stamm wächst auf Cellulose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle mit  $\text{KNO}_3$  als einzige Stickstoffquelle, z.B. auf Filterpapier über ST21 Mineralsalzagar (0.1%  $\text{KNO}_3$ ; 0.1%  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 0.1%  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 0.1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0.01%  $\text{MnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 0.02%  $\text{FeCl}_3$ ; 0.002% Hefeextrakt; Standard-Spurenelementlösung; 1% Agar). Auf diesem Medium werden dunkelrotbraune bis schwarzbraune Fruchtkörper gebildet, bestehend aus kleinen Sporangiolen (etwa 15 bis 30  $\mu\text{m}$  Durchmesser) in mehr oder weniger großen dichten Haufen und Paketen.

Der Stamm wächst sehr gut mit Glucose und  $\text{KNO}_3$ , z.B. auf CA2-Agar (Grundmedium: 1.5 g Agar in 92 ml Aqua dest.; Stammlösung 1: 7.5%  $\text{KNO}_3$ , 7.5%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  in Aqua dest.; Stammlösung 2: 1.5%  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  in Aqua dest.; Stammlösung 3: 0.2%  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0.15%  $\text{FeCl}_3$  in Aqua dest.; Stammlösung 4: 20% Glucose in Aqua dest. Die Stammlösungen werden durch Autoklavieren sterilisiert. Je 1 ml der Lösungen 1 bis 3, sowie 5 ml der Lösung 4 werden dem Grundmedium zugegeben, ebenso eine geeignete Menge einer Spurenelementlösung).

Die vegetativen Stäbchen haben die für *Sorangium* typische Form (relativ derbe, im Phasenkontrastmikroskop dunkle, zylindrische Stäbchen mit breit abgerundeten Enden, im Mittel 3 - 6 µm lang und 1 µm dick). Nach längerer Adaptation an das Wachstum in Flüssigmedien wächst der Stamm in homogener Zellsuspension.

Der Stamm So ce90 produziert chemisch nahe verwandte Verbindungen, die antibiotische Aktivität besitzen. Insbesondere sind diese Verbindungen cytotoxisch sowie antifungal wirksam. Hervorzuheben ist z.B. die Hemmung von *Mucor hiemalis*.

#### Produktion der biologisch aktiven Verbindungen:

Die Verbindungen werden während der logarithmischen bis hin zur stationären Wachstumsphase produziert. Eine typische Fermentation verläuft folgendermaßen: Ein 100 l-Fermenter wird mit 60 l Medium (0.8% Stärke; 0.2% Glucose; 0.2% Soyamehl; 0.2% Hefeextrakt; 0.1%  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 0.1%  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 8 mg/l Fe-EDTA; pH 7.4) gefüllt. Beimpft wird mit 10 l einer im gleichen Medium jedoch zusätzlich mit 50 mM HEPES-Puffer pH 7.4 in Schüttelkolben angezogenen Vorkultur (160 upm, 30 °C). Fermentiert wird bei 32 °C mit einer Rührgeschwindigkeit von 500 upm und einer Belüftung von 0.2. NL pro  $\text{m}^3$  und Std, der pH Wert wird durch Zugabe von KOH bei 7.4 gehalten. Die Fermentation dauert 7 - 10 Tage. Die gebildeten aktiven Verbindungen befinden sich teils im Überstand und teils in den Zellen.

Alternativ dazu kann in Gegenwart von Adsorberharzen (z.B. XAD-1180, Rohm und Haas, 2 - 5 %) fermentiert werden.

#### Isolierung von Epothilon A und B

Während der Fermentation von *Sorangium cellulosum* So ce90 (z.B. 70 l Fermentationsvolumen) in Gegenwart eines Adsorberharzes (z.B.: XAD-1180, Röhm und Haas, 2 % v/v) werden die gebildeten Antibiotika Epothilon A (Abb. 1) und B (Abb. 2) vollständig an das Harz gebunden. Nach Abtrennung der Kulturbrühe (z.B. durch Absieben in einem Prozeßfilter) wird das Harz mit 3 Bettvolumen Wasser gewaschen und mit 4 Bettvolumen Methanol eluiert. Die vereinigten Eluate werden im Vakuum bis auf den Wassergehalt eingeeengt und dreimal mit je 0.2 l Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetatextrakte werden zur Trockne eingeeengt (ca. 40 g Trockengewicht).

Der Rohextrakt wird in 50 ml Methanol aufgenommen und an Lichroprep RP-18 25-40  $\mu\text{m}$  (Säule: 400 x 100 mm; Fluß: 200 ml/min; Merck Prepbar) isokratisch mit Methanol/Wasser 6/4 chromatographiert. Die Epothilone enthaltenden Fraktionen ( $R_t$  ca. 95 - 125 min) werden durch RP-18 Niederdruckchromatographie aufgereinigt. (Säule 400 x 60; HD-Sil-18-20-60, Labomatic; Laufmittel: Methanol/Wasser 65/35; Fluß 25 ml/min;  $R_t$  Epothilon A: 140 - 165 min;  $R_t$  Epothilon B: 170 - 195 min).

Die Feinreinigung der Epothilone erfolgt durch Kristallisation aus

1. Epothilon A: Toluol/Ethylacetat = 3 : 2
2. Epothilon B: Ethylacetat

### Epothilon A

$\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{NO}_6\text{S}$  [493]

FAB-MS (neg. Ionen): 492.25 für  $(\text{M} - \text{H})^-$

$^1\text{H}$ -NMR-Daten s. Tab. 1

$^{13}\text{C}$ -NMR-Daten s. Tab. 2

UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\log \epsilon$ ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Intran:

$\nu$ : 3429; 2966; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087; 1029; 1014; 979  $\text{cm}^{-1}$

DC:  $R_F$  = 0,75

DC-Alufolie 60 F<sub>254</sub>, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion: 1. UV-Löschung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanillin/Schweifelsäure-Reagenz und erhitzen auf 120 °C, braune Anfärbung

HPLC:  $R_t$  = 5,4 min

Säule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7  $\mu\text{m}$ , Merck;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

**Epothilon B**

$C_{27}H_{41}NO_6S$  [507]

FAB-MS (neg. Ionen): 506.25 für  $(M - H)^-$

$^1H$ -NMR-Daten s. Tab. 1

$^{13}C$ -NMR-Daten s. Tab. 2

UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Irtran:

$\nu$  = 3400; 2958; 2931; 2875; 1735; 1689; 1629; 1609; 1463; 1378; 1250; 1149; 1049; 977  $cm^{-1}$

DC:  $R_F$  = 0,75

DC-Alufolie 60 F<sub>254</sub>, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion: 1. UV-Löschung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzt auf 120 °C,  
braune Anfärbung

HPLC:  $R_t$  = 6,3 min

Säule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7  $\mu m$ , Merck;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

Tabelle 1

<sup>1</sup> H-NMR-Daten der Epothilone A und B				
Atom	A		B	
2a	2,4	dd	2,22	dd
2b	2,52	dd	2,53	da
3	4,19	dd	4,24	dd
6	3,2	m	3,28	m
7	3,78	dd	3,75	dd
8	1,73	m	1,73	m
9a	1,4	m	1,4	m
9b	1,52	m	1,5	m
10a	1,4	m	1,4	m
10b	1,4	m	1,4	m
11a	1,42	m	1,42	m
11b	1,7	m	1,7	m
12	2,9	ddd	-	
13	3,01	ddd	2,8	dd
14a	1,85	ddd	1,9	ddd
14b	2,11	ddd	2,1	ddd
15	5,41	dd	5,41	dd
17	6,6	s	6,6	s
19	6,99	s	6,99	s
21*	1,08	s	1,05	s
22*	1,35	s	1,36	s
23	1,15	d	1,15	d
24	0,93	d	0,92	d
25	2,05	s	2,05	s
26	2,69	s	2,69	s
			1,28	s

\*) Zuordnung vertauschbar

Tabelle 2

<sup>13</sup> C-NMR-Daten der Epothilone A und B		
Atom	A	B
1	170,5	170,5
2	39,1	39,4
3	73,2	72,9
4	53,0	53,2
5	219,9	219,8
6	43,5	43,1
7	74,7	74,3
8	36,4	36,6
9	30,7	30,9
10	23,6	22,5
11	27,6	32,3
12	57,4	61,3
13	54,6	61,7
14	31,7	32,4
15	76,8	76,9
16	137,4	137,5
17	120,1	120,0
18	152,1	152,1
19	116,3	116,2
20	165,0	165,1
21	20,4	19,7
22	21,6	21,5
23	14,1	13,7
24	17,1	17,1
25	15,6	15,7
26	19,1	19,0
27		22,7

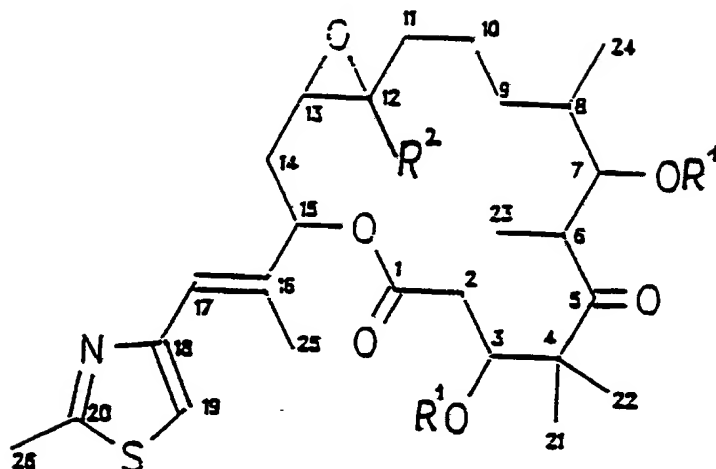
\*) Zuordnung vertauschbar

**Anwendungsbeispiel**

Nach bekannten Methoden (T. Meyer, U. Renegass, D. Fabbro, E. Alteri, J. Rösel, M. Müller, G. Caravatti & A. Matter: A derivative of staurosporine (CGP 41 251) shows selectivity for protein kinase C inhibition and in vitro anti-proliferative as well as in vivo anti-tumor activity. Int. J. Cancer 1989, 43, 851-6) wird Epothilon A auf die Hemmung der T-24 Zelllinie untersucht. Es wird ein  $IC_{50}$  Wert von  $< 0.05 \mu M$  ermittelt.

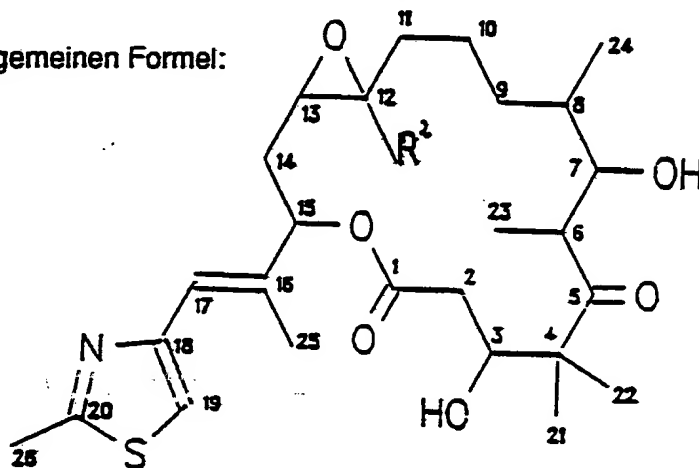
# **Patentansprüche**

## **1. Epothilone der allgemeinen Formel:**



worin R<sup>1</sup> Wasserstoff, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Acyl, Li<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, 1/2 Mg<sup>2+</sup> oder 1/2 Ca<sup>2+</sup> bedeutet und R<sup>2</sup> Wasserstoff oder eine Methylgruppe darstellt.

## **2. Epothilone der allgemeinen Formel:**



worin R<sup>2</sup> Wasserstoff oder Methyl ist.

## **3. Epothilon, *gekennzeichnet* durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:**



<sup>1</sup> H-NMR-Daten			<sup>13</sup> C-NMR-Daten	
Atom			Atom	
2a	2,4	dd	1	170,5
2b	2,52	dd	2	39,1
3	4,19	dd	3	73,2
6	3,2	m	4	53,0
7	3,78	dd	5	219,9
8	1,73	m	6	43,5
9a	1,4	m	7	74,7
9b	1,52	m	8	36,4
10a	1,4	m	9	30,7
10b	1,4	m	10	23,6
11a	1,42	m	11	27,6
11b	1,7	m	12	57,4
12	2,9	ddd	13	54,6
13	3,01	ddd	14	31,7
14a	1,85	ddd	15	76,8
14b	2,11	ddd	16	137,4
15	5,41	dd	17	120,1
17	6,6	s	18	152,1
19	6,99	s	19	116,3
21*	1,08	s	20	165,0
22*	1,35	s	21*	20,4
23	1,15	d	22*	21,6
24	0,93	d	23	14,1
25	2,05	s	24	17,1
26	2,69	s	25	15,6
			26	19,1

\*) Zuordnung vertauschbar

$C_{26}H_{39}NO_6S$  [493]

FAB-MS (neg. Ionen): 492.25 für  $(M - H)^-$

UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Intran:

v: 3429; 2966; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087; 1029; 1014; 979  $cm^{-1}$

DC:  $R_F = 0,75$

DC-Alufolie 60 F<sub>254</sub>, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion: 1. UV-Löschung bei 254 nm  
2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzen auf 120 °C,  
braune Anfärbung

HPLC:  $R_t = 5,4$  min

Säule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7  $\mu m$ , Merck:

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

4. Epothilon, *gekennzeichnet* durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:

<sup>1</sup> H-NMR-Daten			<sup>13</sup> C-NMR-Daten	
Atom			Atom	
2a	2,22	dd	1	170,5
2b	2,53	dd	2	39,4
3	4,24	dd	3	72,9
6	3,28	m	4	53,2
7	3,75	dd	5	219,8
8	1,73	m	6	43,1
9a	1,4	m	7	74,3
9b	1,5	m	8	36,6
10a	1,4	m	9	30,9
10b	1,4	m	10	22,5
11a	1,42	m	11	32,3
11b	1,7	m	12	61,3
12	-		13	61,7
13	2,8	dd	14	32,4
14a	1,9	ddd	15	76,9
14b	2,1	ddd	16	137,5
15	5,41	dd	17	120,0
17	6,6	s	18	152,1
19	6,99	s	19	116,2
21*	1,05	s	20	165,1
22*	1,36	s	21*	19,7
23	1,15	d	22*	21,5
24	0,92	d	23	13,7
25	2,05	s	24	17,1
26	2,69	s	25	15,7
27	1,28	s	26	19,0
			27	22,7 (R <sup>1</sup> = CH <sub>3</sub> )

\*) Zuordnung vertauschbar

$C_{27}H_{41}NO_6S$  [507]

FAB-MS (neg. Ionen): 506.25 für  $(M - H)^-$

UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  ( $\log \epsilon$ ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Intran:

$\nu$  = 3400; 2958; 2931, 2875; 1735; 1689; 1629; 1609; 1463; 1378; 1250; 1149; 1049; 977  $cm^{-1}$

DC:  $R_F$  = 0,75

DC-Alufolie 60 F<sub>254</sub>, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion: 1. UV-Löschung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzt auf 120 °C,  
braune Anfärbung

HPLC:  $R_t$  = 6,3 min

Säule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7  $\mu m$ , Merck;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser= 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

5. Verfahren zum Herstellen von Epothilonen nach einem der vor anstehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß man den Stamm So ce90

- in einem Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen und Mineralsalze enthaltenden Medium kultiviert,
- entweder während der Kultivierung des Stammes oder anschließend ein Adsorberharz zusetzt,
- die Fermenterbrühe abtrennt,
- die Epothilone aus dem Adsorberharz eluiert und
- die Eluate direkt oder über weitere Reinigungsschritte von dem/den Lösungsmittel(n) befreit,
- und gegebenenfalls über Hochdruck/Niederdruckchromatographie und/oder Umkristallisation die verschiedenen Epothilone aufreinigt und voneinander trennt.

6. Mittel für den Pflanzenschutz in der Landwirtschaft und Forstwirtschaft und/oder im Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren Epothilonen gemäß einem der voranstehenden Ansprüche oder eines oder mehrerer dieser Epothilone enthaltend, gegebenenfalls neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

7. Mittel nach Anspruch 6, dadurch **gekennzeichnet**, daß es ein Fungizid oder Fungistatikum ist.

8. Therapeutisches Mittel, das insbesondere cytotoxische Aktivitäten entwickeln und/oder Immunsuppression bewirken kann, bestehend aus einem oder mehreren Epothilonen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder diese Epothilone enthaltend, gegebenenfalls neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/02656

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. 5 C07D 493/04; C12P 17/18; A01N 43/90; A61K 31/425  
/(C07D493/04,313:00,303:00)(C12P17/18,C12R1:00)  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl. 5 C07D; C12P; A01N; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 93, No. 7, 18 August 1980, Columbus, Ohio, US; abstract No. 72218v, Y. SHIMAUCHI ET AL. 'Deltamycin antibiotics' page 1025; see abstract & JP, A, 54 038 113 (SANRAKU-OCEAN CO.) 19 November 1979, compound with CN: 74226-44-1  -----	1

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
11 February 1993 (11.02.93)Date of mailing of the international search report  
25 February 1993 (25.02.93)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/EP 92/02656

Internationales Aktenzeichen

<b>I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS</b> (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) <sup>6</sup>		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC <b>Int.Kl. 5 C07D493/04; C12P17/18; A01N43/90; A61K31/425</b> <b>/(C07D493/04,313:00,303:00)(C12P17/18,C12R1:00)</b>		
<b>II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE</b>		
Recherchiertes Mindestprüfstoff <sup>7</sup>		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
<b>Int.Kl. 5</b>	<b>C07D ; C12P ; A01N ; A61K</b>	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen <sup>8</sup>		
<b>III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN <sup>9</sup></b>		
Art <sup>a</sup>	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>
<b>A</b>	<b>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 93, no. 7, 18. August 1980, Columbus, Ohio, US; abstract no. 72218v, Y. SHIMAUCHI ET AL. 'Deltamycin antibiotics' Seite 1025 ; siehe Zusammenfassung &amp; JP,A,54 038 113 (SANRAKU-OCEAN CO.) 19. November 1979 Verbindung mit CN: 74226-44-1</b>	<b>1</b>
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>a</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen <sup>10</sup> :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzunehmen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benennung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
<b>IV. BESCHEINIGUNG</b>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche <div style="text-align: center; font-weight: bold;">11.FEBRUAR 1993</div>		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts <div style="text-align: center; font-weight: bold;">25. 02. 93</div>
Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center; font-weight: bold;">EUROPAISCHES PATENTAMT</div>		Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten <div style="text-align: center; font-weight: bold;">VOYIAZOGLOU D.</div>

PTO 03-1133

International Patent Application No. WO 93/10121

EPOTHILONES, PROCESS FOR PREPARING THE SAME AND THEIR USE AS  
MEDICAMENTS AND AS PLANT PROTECTING AGENTS

Gerhard HÖFLE et al.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE  
WASHINGTON, D.C. DECEMBER 2002  
TRANSLATED BY THE RALPH MCELROY TRANSLATION COMPANY



INTERNATIONAL PATENT OFFICE  
WORLD ORGANIZATION FOR INTELLECTUAL PROPERTY

International patent published on  
the basis of the Patent Cooperation Treaty  
INTERNATIONAL PUBLICATION NO. WO 93/10121

International Patent Classification <sup>5</sup> :	C 07 D	493/04
	C 12 P	17/18
	A 01 N	43/90
	A 61 K	31/425
	/(C 07 D	493/04
		313:00
		303:00)
	(C 12 P	17/18
	C 12 R	1:00)

International Filing No.: PCT/EP92/02656

International Filing Date: November 19, 1992

International Publication Date: May 27, 1993

Priority

Date:	November 19, 1991
Country:	Germany
No.:	P 41 38 042.8

Designated States: AU, CA, FI, HU, JP, KR, NO, US,  
European Patent (AT, BE, CH, DE,  
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU,  
MC, NL, SE)

EPOTHILONES, PROCESS FOR PREPARING THE SAME AND THEIR USE AS  
MEDICAMENTS AND AS PLANT PROTECTING AGENTS

[Epothilone, deren Herstellungsverfahren und ihre Verwendung als Arzneimittel und  
Pflanzenschützende Mittel]

Inventors and

Inventors/Applicants (only for US):

Gerhard HÖFLE et al.

Applicants (for all designated

states except US):

GESELLSCHAFT FÜR  
BIOTECHNOLOGISCHE  
FORSCHUNG MBH (GBF);  
CIBA-GEIGY AG

Published

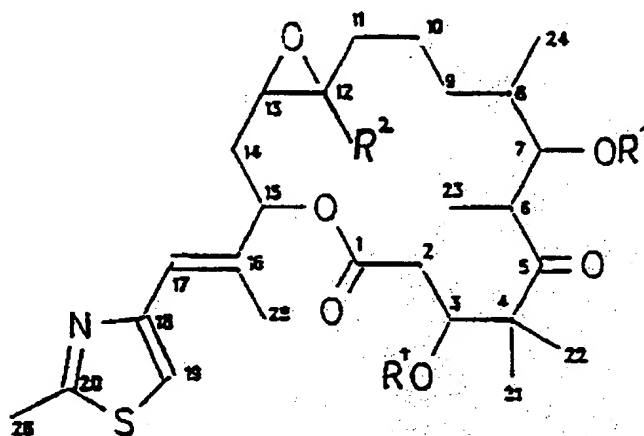
With International Search Report.

## FOR INFORMATION ONLY

Codes for the identification of PCT contract states on the cover sheets of the documents that publish the international applications in accordance with the PCT.

AT	Austria	ML	Mali
AU	Australia	MN	Mongolia
BB	Barbados	MR	Mauritania
BE	Belgium	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	NL	Netherlands
BG	Bulgaria	NO	Norway
BJ	Benin	NZ	New Zealand
BR	Brazil	PL	Poland
CA	Canada	PT	Portugal
CF	Central African Republic	RO	Romania
CG	Congo	RU	Russian Federation
CH	Switzerland	SD	Sudan
CI	Côte d'Ivoire	SE	Sweden
CM	Cameroon	SK	Slovak Republic or Slovakia, follow original
CS	Czechoslovakia	SN	Senegal
CZ	Czech Republic	SU	Soviet Union
DE	Germany	TD	Chad
DK	Denmark	TG	Togo
ES	Spain	UA	Ukraine
FI	Finland	US	United States of America
FR	France	VN	Vietnam
GA	Gabon	YU	Yugoslavia
GB	United Kingdom		
GN	Guinea		
GR	Greece		
HU	Hungary		
IE	Ireland		
IT	Italy		
JP	Japan		
KP	Democratic People's Republic of Korea		
KR	South Korea or Republic of Korea, follow original		
KZ	Kazakhstan		
LI	Liechtenstein		
LK	Sri Lanka		
LU	Luxembourg		
MC	Monaco		
MG	Madagascar		

The invention pertains to epothilones of the following general formula:



in which  $R^1$  represents hydrogen,  $C_1$ - $C_4$  alkyl,  $C_1$ - $C_4$  alkanoyl,  $Li^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $1/2 Mg^{2+}$  or  $1/2 Ca^{2+}$ , and  $R^2$  represents hydrogen or a methyl group.

In addition, the invention pertains to an epothilone that is characterized by one or more of the following parameters:

<sup>1</sup> H-NMR-Daten ①			<sup>13</sup> C-NMR-Daten ②	
Atom			Atom	
2a	2,4	dd	1	170,5
2b	2,52	dd	2	39,1
3	4,19	dd	3	73,2
6	3,2	m	4	53,0
7	3,78	dd	5	219,9
8	1,73	m	6	43,5
9a	1,4	m	7	74,7
9b	1,52	m	8	36,4
10a	1,4	m	9	30,7
10b	1,4	m	10	23,6
11a	1,42	m	11	27,6
11b	1,7	m	12	57,4
12	2,9	ddd	13	54,6
13	3,01	ddd	14	31,7
14a	1,85	ddd	15	76,8
14b	2,11	ddd	16	137,4
15	5,41	dd	17	120,1
17	6,6	s	18	152,1
19	6,99	s	19	116,3
21*	1,08	s	20	165,0
22*	1,35	s	21*	20,4
23	1,15	d	22*	21,6
24	0,93	d	23	14,1
25	2,05	s	24	17,1
26	2,69	s	25	15,6
			26	19,1

\*) Zuordnung vertauschbar ③

Key: 1 <sup>1</sup>H-NMR data  
 2 <sup>13</sup>C-NMR data  
 3 \*) Assignment interchangeable

C<sub>26</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>6</sub>S [493]

FAB-MS (neg. ions): 492.25 for (M - H)<sup>-</sup>

UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR film on Irtran:

$\nu$ : 3429, 2966; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087; 1029;  
1014; 979  $\text{cm}^{-1}$

TLC:  $R_F = 0.75$

TLC aluminum foil 60 F<sub>254</sub>, Merck; eluent:

dichloromethane/methanol = 90:10

detection:                   1.     UV extinction at 254 nm  
                              2.     spraying with vanillin/sulfuric acid reagent and heating to 120°C,  
brown coloration

HPLC:  $R_t = 5.4$  min

column: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7  $\mu\text{m}$ , Merck;

flow: 1.5 mL/min; eluent: methanol/water = 65:35

detector: UV 254 nm

In addition, the invention pertains to an epothilone that is characterized by one or more of the following parameters:

<sup>1</sup> H-NMR-Daten ①			<sup>13</sup> C-NMR-Daten ②		
Atom			Atom		
2a	2,22	dd	1	170,5	
2b	2,53	dd	2	39,4	
3	4,24	dd	3	72,9	
6	3,28	m	4	53,2	
7	3,75	dd	5	219,8	
8	1,73	m	6	43,1	
9a	1,4	m	7	74,3	
9b	1,5	m	8	36,6	
10a	1,4	m	9	30,9	
10b	1,4	m	10	22,5	
11a	1,42	m	11	32,3	
11b	1,7	m	12	61,3	
12	-		13	61,7	
13	2,8	dd	14	32,4	
14a	1,9	ddd	15	76,9	
14b	2,1	ddd	16	137,5	
15	5,41	dd	17	120,0	
17	6,6	s	18	152,1	
19	6,99	s	19	116,2	
21*	1,05	s	20	165,1	
22*	1,36	s	21*	19,7	
23	1,15	d	22*	21,5	
24	0,92	d	23	13,7	
25	2,05	s	24	17,1	
26	2,69	s	25	15,7	
27	1,28	s	26	19,2	(R <sup>1</sup> = CH <sub>3</sub> )

\*) Zuordnung vertauschbar ③

Key: 1 <sup>1</sup>H-NMR data  
 2 <sup>13</sup>C-NMR data  
 3 \*) Assignment interchangeable

C<sub>27</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>6</sub>S [507]

FAB-MS (neg. ions): 506.25 for (M - H)<sup>-</sup>

UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR film on Irtran:

$\nu$ : 3400, 2958; 2931; 2875; 1735; 1689; 1629; 1609; 1463; 1378; 1250; 1149; 1049; 977  $\text{cm}^{-1}$

TLC:  $R_F = 0.75$

TLC aluminum foil 60 F<sub>254</sub>, Merck; eluent:

dichloromethane/methanol = 90:10

detection: 1. UV extinction at 254 nm  
2. spraying with vanillin/sulfuric acid reagent and heating to 120°C,  
brown coloration

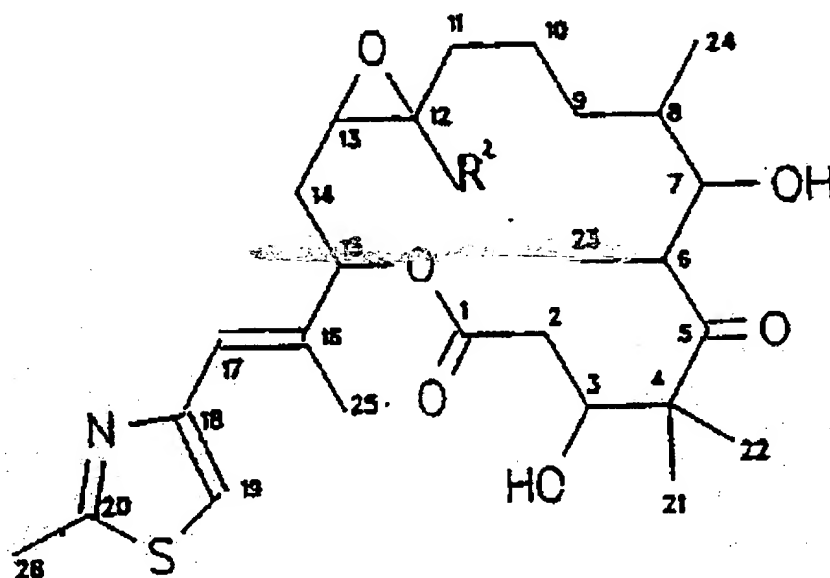
HPLC:  $R_t = 6.3$  min

column: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7  $\mu\text{m}$ , Merck;

flow: 1.5 mL/min; eluent: methanol/water = 65:35

detector: UV 254 nm

Epothilones of the following structural formula are especially preferred



in which  $R^2$  signifies hydrogen or methyl. (The carbon atom of the methyl group is designated C27). In addition, the invention pertains to a process for obtaining epothilones, especially the epothilones that have been characterized above and that are characterized by the fact that the strain So ce90 DSM 6773



- is cultivated in a medium that contains sources of carbon, sources of nitrogen, and mineral salts;
- an absorber resin is added either during cultivation of the strain or subsequently;
- the fermenter broth is separated;
- the epothilones are eluted out of the absorber resin, and
- the eluate is liberated from the solvent(s) directly or via additional purification steps;
- the various epothilones are purified and separated from one another optionally via high pressure/low pressure chromatography and/or recrystallization.

If required, the epothilones that are obtained in this way are reacted further using conventional chemical processes, e.g. with bases to give alkali metal salts and alkaline earth salts and optionally further to give ethers, or they can be transformed into the corresponding esters using organic acids.

In addition the invention pertains to an agent for plant protection in agriculture, forestry, and/or horticulture comprising one or more of the epothilones that are listed above, or containing one or more of these epothilones, optionally in addition to one or more conventional vehicles and/or diluents.

Finally, the invention pertains to a therapeutic medicament, particularly one that can develop cytotoxic activity and/or produce immune suppression, comprising one or more of the epothilones that are listed above, or containing one or more of these epothilones, optionally in addition to one or more conventional vehicles and/or diluents.

- Form of administration: oral.
- Dose: 0.5 to 200 mg for a person with a normal weight of 70 kg.
- Purpose for which used: anti-tumor.

In the following sections, the invention will be elucidated in more detail by means of examples and experimental data.

#### Production strain

In July 1985, the strain So ce90 was isolated at the Society for Biotechnological Research (GBF) from a bottom sample from the banks of the Zambezi in southern Africa. The strain has been filed in the German Collection of Microorganisms (DSM) under No. 6773.

Strain cultivation and morphological description: the strain grows on cellulose as the only source of carbon and energy together with  $\text{KNO}_3$  as the only source of nitrogen, e.g. on filter paper over ST21 mineral salt agar (0.1%  $\text{KNO}_3$ ; 0.1%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.1%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0.1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0.01%  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.02%  $\text{FeCl}_3$ ; 0.002% yeast extract; standard trace element solution; 1% agar). Dark red-brown to black-brown spores are formed on this medium, whereby

these spores consist of small sporangia (approximately 15 to 30  $\mu\text{m}$  diameter) in compact heaps and packets of greater or lesser size.

The strain grows very well with glucose and  $\text{KNO}_3$ , e.g. on CA2 agar (base medium: 1.5 g agar in 92 mL of distilled water; parent solution 1: 7.5%  $\text{KNO}_3$ , 7.5%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  in distilled water; parent solution 2: 1.5%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  in distilled water; parent solution 3: 0.2%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.15%  $\text{FeCl}_3$  in distilled water; parent solution 4: 20% glucose in distilled water. The parent solutions are sterilized via treatment in an autoclave. 1 mL of solutions 1 through 3 in each case, and 5 mL of solution 4 are added to the base medium along with a suitable quantity of a trace element solution).

The small vegetative rods have the typical shape of *Sorangium* [sic] (relatively coarse; small, dark, cylindrical rods with broadly rounded off ends as seen in the phase contrast microscope; 3-6  $\mu\text{m}$  long and 1  $\mu\text{m}$  thick, on average). After extended adaptation to growth in liquid media, the strain grows in a homogeneous suspension of cells.

Strain So ce90 produces compounds that are chemically closely related and that possess antibiotic activity. In particular, these compounds are active both cytotoxically and antifungally. The inhibition of *Mucor hiemalis* can be highlighted, for example.

#### Production of the biologically active compounds:

The compounds are produced during the logarithmic phase through to the stationary growth phase. A typical fermentation reaction proceeds in the following manner: a 100 L fermenter is filled with 60 L of medium (0.8% starch; 0.2% glucose; 0.2% soy flour; 0.2% yeast extract; 0.1%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0.1%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 8 mg/L Fe-EDTA; pH 7.4). Inoculation takes place with 10 L of a pre-culture which had been cultivated in the same medium in a shaken flask but additionally with 50 mM of HEPES buffer pH 7.4 (160 RPM; 30°C). Fermentation is carried out at 32°C using a stirring speed of 500 RPM and an aeration rate of 0.2 NL per  $\text{m}^3$  per hour; the pH value is held at 7.4 by adding KOH. Fermentation lasts for 7-10 days. The active compounds that are formed are found to be partly in the supernatant liquor and partly in the cells.

Alternatively, fermentation can be carried out in the presence of absorber resins (e.g. XAD-1180, Rohm and Haas, 2-5%).

#### Isolation of Epothilone A and B

The antibiotics epothilone A (Fig. 1) and B (Fig. 2), which are formed during the fermentation of *Sorangium* [sic] *cellulosum* So ce90 (e.g. with a fermentation volume of 70 L) in the presence of an absorber resin (e.g. XAD-1180, Rohm and Haas, 2 vol%), are completely bound to the resin. After separating the culture broth (e.g. by sieving off in a process filter), the resin is washed with 3 bed volumes of water, and eluted with 4 bed volumes of methanol. The

combined eluates are concentrated via evaporation in a vacuum down to the desired water content, and extracted three times with 0.2 L of ethyl acetate on each occasion. The combined ethyl acetate extracts are evaporated to dryness (dry weight: approximately 40 g).

The crude extract is taken up in 50 mL of methanol and isocratically chromatographed with 6/4 methanol/water on Lichroprep RP-18 25-40  $\mu\text{m}$  (column: 400 x 100 mm; flow rate: 200 mL/min; Merck Prepbar). The epothilone-containing fractions ( $R_t$  approximately 95-125 min) are purified via RP-18 low pressure chromatography. (Column 400 x 60; HD-Sil-18-20-60, Labomatic; eluent: 65/35 methanol/water; flow rate 25 mL/min;  $R_t$  epothilone A: 140-165 min;  $R_t$  epothilone B: 170-195 min).

High grade purification of the epothilones takes place via crystallization from

1. epothilone A: 3:2 toluene/ethyl acetate
2. epothilone B: ethyl acetate

#### Epothilone A

$\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{NO}_6\text{S}$  [493]

FAB-MS (neg. ions): 492.25 for  $(\text{M} - \text{H})^-$

$^1\text{H}$ -NMR data: see Table 1

$^{13}\text{C}$ -NMR data: see Table 2

UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\log \epsilon$ ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR film on Irtran:

$\nu$ : 3429, 2966; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087; 1029; 1014; 979  $\text{cm}^{-1}$

TLC:  $R_F$  = 0.75

TLC aluminum foil 60 F<sub>254</sub>, Merck; eluent:

dichloromethane/methanol = 90:10

- |            |    |   |
|------------|----|---|
| detection: | 1. | UV extinction at 254 nm   |
|            | 2. | spraying with vanillin/sulfuric acid reagent and heating to 120°C, brown coloration |

HPLC:  $R_t$  = 5.4 min

column: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7  $\mu\text{m}$ , Merck;

flow: 1.5 mL/min; eluent: methanol/water = 65:35

detector: UV 254 nm

#### Epothilone B

$C_{27}H_{41}NO_6S$  [507]

FAB-MS (neg. ions): 506.25 for  $(M - H)^-$

$^1H$ -NMR data: see Table 1

$^{13}C$ -NMR data: see Table 2

UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  ( $\log \epsilon$ ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR film on Irtran:

$\nu$ : 3400, 2958; 2931; 2875; 1735; 1689; 1629; 1609; 1463; 1378; 1250; 1149; 1049; 977  $cm^{-1}$

TLC:  $R_F$  = 0.75

TLC aluminum foil 60 F<sub>254</sub>, Merck; eluent:

dichloromethane/methanol = 90:10

- detection:
1. UV extinction at 254 nm
  2. spraying with vanillin/sulfuric acid reagent and heating to 120°C, brown coloration

HPLC:  $R_t$  = 6.3 min

column: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7  $\mu m$ , Merck;

flow: 1.5 mL/min; eluent: methanol/water = 65:35

detector: UV 254 nm

Table 1

① <sup>1</sup>H-NMR-Daten der Epothilone A und B

Atom	A		B	
2a	2,4	dd	2,22	dd
2b	2,52	dd	2,53	dd
3	4,19	dd	4,24	dd
6	3,2	m	3,28	m
7	3,78	dd	3,75	dd
8	1,73	m	1,73	m
9a	1,4	m	1,4	m
9b	1,52	m	1,5	m
10a	1,4	m	1,4	m
10b	1,4	m	1,4	m
11a	1,42	m	1,42	m
11b	1,7	m	1,7	m
12	2,9	ddd	-	
13	3,01	ddd	2,8	dd
14a	1,85	ddd	1,9	ddd
14b	2,11	ddd	2,1	ddd
15	5,41	dd	5,41	dd
17	6,6	s	6,6	s
19	6,99	s	6,99	s
21*	1,08	s	1,05	s
22*	1,35	s	1,36	s
23	1,15	d	1,15	d
24	0,93	d	0,92	d
25	2,05	s	2,05	s
26	2,69	s	2,69	s
			1,28	s

②\*) Zuordnung vertauschbar

Key: 1 <sup>1</sup>H-NMR data for epothilones A and B  
 2 \*) Assignment interchangeable

Table 2

① <sup>13</sup>C-NMR-Daten der Epothilone A und B

Atom	A	B
1	170,5	170,5
2	39,1	39,4
3	73,2	72,9
4	53,0	53,2
5	219,9	219,8
6	43,5	43,1
7	74,7	74,3
8	36,4	36,6
9	30,7	30,9
10	23,6	22,5
11	27,6	32,3
12	57,4	61,3
13	54,6	61,7
14	31,7	32,4
15	76,8	76,9
16	137,4	137,5
17	120,1	120,0
18	152,1	152,1
19	116,3	116,2
20	165,0	165,1
21	20,4	19,7
22	21,6	21,9
23	14,1	13,7
24	17,1	17,1
25	15,6	15,7
26	19,1	19,0
27		22,7

②\*) Zuordnung vertauschbar

Key: 1 <sup>13</sup>C-NMR data for epothilones A and B  
 2 \*) Assignment interchangeable

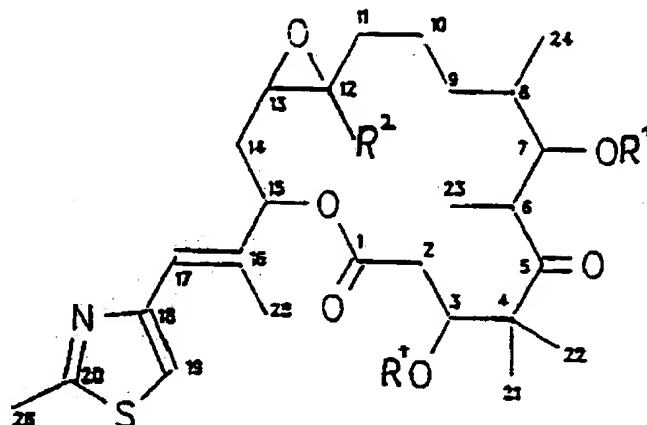
Example illustrating usage

Epothilone A was examined in terms of inhibition of the T-24 cell line in accordance with known methods (T. Meyer, U. Renegass, D. Fabbro, E. Alteri, J. Rösel, M. Müller, G. Caravatti & A. Matter: A derivative of staurosporine (CGP 41 251) shows selectivity for protein kinase C

inhibition and in vitro anti-proliferative as well as in vivo anti-tumor activity, *Int. J. Cancer* 1989, 43, 851-6). An  $IC_{50}$  value of  $< 0.05 \mu M$  is found.

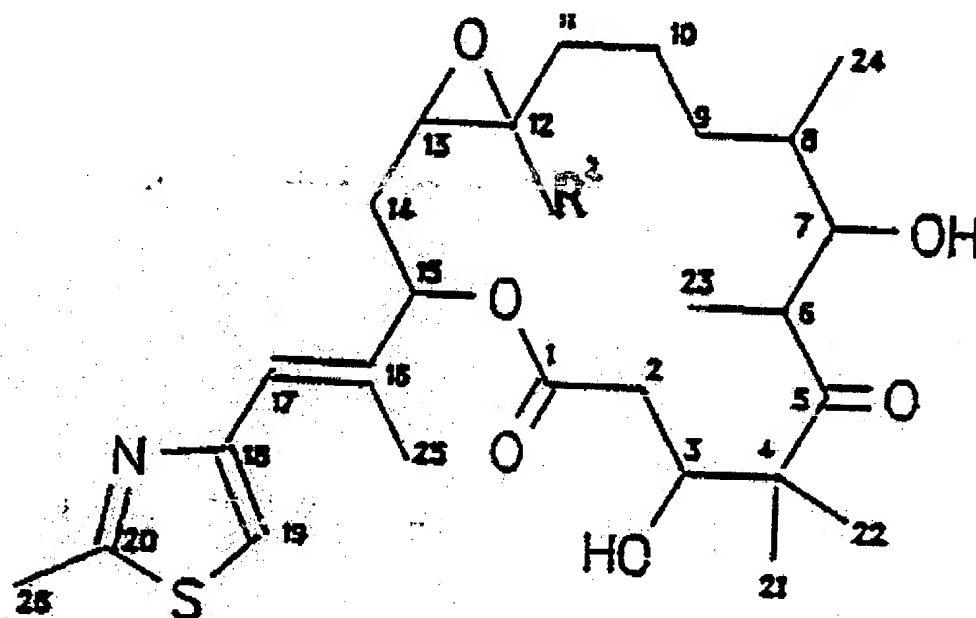
### Claims

1. Epothilones of general formula:



in which  $R^1$  represents hydrogen,  $C_1$ - $C_4$  alkyl,  $C_1$ - $C_4$  acyl,  $Li^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $1/2 Mg^{2+}$  or  $1/2 Ca^{2+}$  and  $R^2$  represents hydrogen or a methyl group.

2. Epothilones of general formula:



in which  $R^2$  signifies hydrogen or methyl.

3. Epothilone, characterized by one or more of the following parameters:

<sup>1</sup> H-NMR-Daten ①			<sup>13</sup> C-NMR-Daten ②		
Atom			Atom		
2a	2,4	dd	1	170,5	
2b	2,52	dd	2	39,1	
3	4,19	dd	3	73,2	
6	3,2	m	4	53,0	
7	3,78	dd	5	219,9	
8	1,73	m	6	43,5	
9a	1,4	m	7	74,7	
9b	1,52	m	8	36,4	
10a	1,4	m	9	30,7	
10b	1,4	m	10	23,6	
11a	1,42	m	11	27,6	
11b	1,7	m	12	57,4	
12	2,9	ddd	13	54,6	
13	3,0i	ddd	14	31,7	
14a	1,85	ddd	15	76,8	
14b	2,11	ddd	16	137,4	
15	5,41	dd	17	120,1	
17	6,6	s	18	152,1	
19	6,99	s	19	116,3	
21*	1,08	s	20	165,0	
22*	1,35	s	21*	20,4	
23	1,15	d	22*	21,6	
24	0,93	d	23	14,1	
25	2,05	s	24	17,1	
26	2,69	s	25	15,6	
			26	19,1	

\*) Zuordnung vertauschbar ③

Key: 1 <sup>1</sup>H-NMR data  
 2 <sup>13</sup>C-NMR data  
 3 \*) Assignment interchangeable

C<sub>26</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>6</sub>S [493]

FAB-MS (neg. ions): 492.25 for (M - H)<sup>-</sup>

UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) = 210 (4.17); 249 (3.97)



IR film on Irtran:

v: 3429, 2966; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087; 1029; 1014; 979  $\text{cm}^{-1}$

TLC:  $R_F = 0.75$

TLC aluminum foil 60 F<sub>254</sub>, Merck; eluent:

dichloromethane/methanol = 90:10

detection:

1. UV extinction at 254 nm
2. spraying with vanillin/sulfuric acid reagent and heating to 120°C, brown coloration

HPLC:  $R_t = 5.4$  min

column: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7  $\mu\text{m}$ , Merck;

flow: 1.5 mL/min; eluent: methanol/water = 65:35

detector: UV 254 nm

4. Epothilone, characterized by one or more of the following parameters:

<sup>1</sup> H-NMR-Daten ①			<sup>13</sup> C-NMR-Daten ②		
Atom			Atom		
2a	2,22	dd	1	170,5	
2b	2,53	dd	2	39,4	
3	4,24	dd	3	72,9	
6	3,28	m	4	53,2	
7	3,75	dd	5	219,8	
8	1,73	m	6	43,1	
9a	1,4	m	7	74,3	
9b	1,5	m	8	36,6	
10a	1,4	m	9	30,9	
10b	1,4	m	10	22,5	
11a	1,42	m	11	32,3	
11b	1,7	m	12	61,3	
12	-		13	61,7	
13	2,8	dd	14	32,4	
14a	1,9	ddd	15	76,9	
14b	2,1	ddd	16	137,5	
15	5,41	dd	17	120,0	
17	6,6	s	18	152,1	
19	6,99	s	19	116,2	
21*	1,05	s	20	165,1	
22*	1,36	s	21*	19,7	
23	1,15	d	22*	21,5	
24	0,92	d	23	13,7	
25	2,05	s	24	17,1	
26	2,69	s	25	15,7	
27	1,28	s	26	19,0	
			27	22,7	(R <sup>1</sup> = CH <sub>3</sub> )

\*) Zuordnung vertauschbar ③

Key: 1 <sup>1</sup>H-NMR data  
 2 <sup>13</sup>C-NMR data  
 3 \*) Assignment interchangeable

C<sub>27</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>6</sub>S [507]

FAB-MS (neg. ions): 506.25 for (M - H)<sup>-</sup>

UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR film on Irtran:

v: 3400, 2958; 2931; 2875; 1735; 1689; 1629; 1609; 1463; 1378; 1250; 1149; 1049; 977  $\text{cm}^{-1}$

TLC:  $R_F = 0.75$

TLC aluminum foil 60 F<sub>254</sub>, Merck; eluent:

dichloromethane/methanol = 90:10

detection:                   1.     UV extinction at 254 nm  
                                  2.     spraying with vanillin/sulfuric acid reagent and heating to 120°C,  
 brown coloration

HPLC:  $R_t = 6.3$  min

column: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7  $\mu\text{m}$ , Merck;

flow: 1.5 mL/min; eluent: methanol/water = 65:35

detector: UV 254 nm

5. Process for the preparation of epothilones in accordance with one of the above claims, characterized by the fact that the strain So ce90

- is cultivated in a medium that contains sources of carbon, sources of nitrogen, and mineral salts;
- an absorber resin is added either during cultivation of the strain or subsequently;
- the fermenter broth is separated;
- the epothilones are eluted out of the absorber resin, and
- the eluate is liberated from the solvent(s) either directly or via additional purification steps;

- the various epothilones are purified and separated from one another optionally via high pressure/low pressure chromatography and/or recrystallization.

6. Agent for plant protection in agriculture and forestry and/or in horticulture comprising one or more of the epothilones in accordance with one of the above claims, or containing one or more of these epothilones, optionally in addition to one or more conventional vehicles and/or diluents.

7. Agent in accordance with Claim 6, characterized by the fact that it is a fungicide or fungistat.

8. Therapeutic medicament, particularly one that can develop cytotoxic activity and/or produce immune suppression, comprising one or more of the epothilones in accordance with one

of the Claims 1 through 4, or containing one or more of these epothilones, optionally in addition to one or more conventional vehicles and/or diluents.

*Inventor's Signature*

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/02656

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. 5 C07D 493/04; C12P 17/18; A01N 43/90; A61K 31/425

///(C07D493/04,313:00,303:00)(C12P17/18,C12R1:00)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl. 5 C07D; C12P; A01N; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 93, No. 7, 18 August 1980, Columbus, Ohio, US; abstract No. 72218v, Y. SHIMAUCHI ET AL. 'Deltamycin antibiotics' page 1025; see abstract & JP, A, 54 038 113 (SANRAKU-OCEAN CO.) 19 November 1979, compound with CN: 74226-44-1	1

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
11 February 1993 (11.02.93)Date of mailing of the international search report  
25 February 1993 (25.02.93)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.